

EOI: <https://eoi.citefactor.org/10.11235/BUAP.05.19.05>

## La terapia antivirulencia como una estrategia contra bacterias multidrogo-resistentes

Ixchell Y. Sedillo-Torres, J. Antonio Ibarra-García \*

Laboratorio de Genética Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Santo Tomás C.P. 11340, Alc. Miguel Hidalgo, Ciudad de México, México

\*Email autor corresponsal: [jaig19@gmail.com](mailto:jaig19@gmail.com)

**Recibido:** 27 julio 2020. **Aceptado:** 24 agosto 2020

### RESUMEN

El incremento en la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos de elección para su tratamiento se ha convertido en un problema de salud mundial que ha sido reconocido por la OMS y que debe ser atendido inmediatamente. De no hacerlo se corre el riesgo de que la humanidad llegue a punto en el que tratamiento de infecciones bacterianas con los antibióticos convencionales no será posible. Se estima que este problema se convertirá en una de las principales causas de muertes para el año 2050 y que, si no se actúa pronto desarrollando nuevas estrategias para evitarlas, estas estadísticas se volverán reales. En este trabajo se resumen los mecanismos de resistencia y se abordan algunas alternativas para tratarlo. Nos hemos enfocado en la terapia antivirulencia por considerarla como factible auxiliar en el problema de la multidrogo-resistencia bacteriana. Esta tiene como característica inhibir o bloquear a los factores de virulencia de bacterias patógenas sin interferir en procesos esenciales para la viabilidad bacteriana.

**Palabras clave:** antibióticos, factores de virulencia, resistencia antimicrobiana, terapia antivirulencia.

### ABSTRACT

The increase in the emergence of bacterial strains resistant to antibiotics commonly used for their treatment has become a global health problem that has been recognized by the WHO and that must be addressed immediately. Not doing it implies that humanity might arrive to a point in which the treatment of bacterial infections with conventional antibiotics would not be possible any more. It is estimated that this problem will become one of the main causes of death by 2050 and that, if previsions are not taken with new strategies to avoid them, these statistics may become real. In this work we



resume the bacterial resistance mechanisms and some alternatives for their treatment are considered. Here we focused on the antivirulence therapy because we believe as a feasible auxiliary in the treatment of multidrug resistant bacteria. This one has as a main feature to inhibit or block the expression of virulence factors present in pathogenic bacteria without interfering in essential processes for bacterial viability.

**Keywords:** Antibiotics, antimicrobial resistance, antivirulence therapy, virulence factors.

## INTRODUCCIÓN

### **Resistencia antimicrobiana: un problema de salud mundial**

Desde la aparición de los antibióticos, con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y su eventual producción en masa en la década de los 40's hasta la actualidad, los antibióticos han sido nuestros aliados para combatir las infecciones bacterianas. Su uso ha permitido la realización de cirugías más seguras y que en tiempos pasados hubieran sido impensables. Han contribuido en la reducción de la morbilidad y mortalidad en humanos y animales. Así, el uso de los antibióticos ha sido la estrategia que durante muchas décadas se ha utilizado para tratar enfermedades bacterianas y ha sido históricamente efectiva. Sin embargo, la rápida adquisición de resistencia a múltiples antibióticos debido a la presión de selección que estos ejercen sobre las bacterias y a la capacidad de estas para adquirir elementos genéticos que codifican para diversos

mecanismos de resistencia, ha aumentado la presencia de cepas resistentes no solo a un tipo de antibiótico, sino a varios de ellos; fenómeno conocido como multidrogo-resistencia o MDR [1]. Si bien es cierto que la resistencia antimicrobiana es generada mediante mecanismos naturales, como mutaciones al azar, también debemos tomar en cuenta que gran parte del problema ha sido por el uso desmesurado de los antibióticos en el área médica humana y veterinaria. Por ejemplo, su uso para la promoción de crecimiento de ganado con fines alimenticios, la eliminación incorrecta de los mismos con su consecuente llegada a depósitos de agua y al suelo, a las malas prácticas de laboratorio para la identificación y fenotipificación de cepas, lo que implica una mala aplicación del tratamiento, entre otros [2]. Todo esto ha favorecido la aparición de bacterias resistentes a antibióticos y su propagación ha incrementado a niveles alarmantes en los últimos años, por lo que el tratamiento de



diversas infecciones bacterianas se ha complicado, principalmente a nivel intrahospitalario y en personas inmunocomprometidas [1]. En 2018 se reportó en Estados Unidos la muerte de al menos 23,000 personas debido a infecciones causadas por cepas resistentes a los antibióticos convencionales y se estima que para el año 2050 morirán 10 millones de personas al año por causas similares, siendo esta una cifra más alta que las muertes esperadas para ese año debidas al cáncer [3].

De acuerdo con lo anterior, la Organización Mundial de la Salud (OMS) activó en el 2016 el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, denominado GLASS por sus siglas en inglés (“Global Antimicrobial Resistance Surveillance System”). Este sistema tiene como objetivo dar seguimiento a las infecciones más frecuentes causadas por bacterias MDR con el fin de ampliar el panorama sobre los patrones y tendencias de las cepas reportadas [4]. El sistema de vigilancia está integrado actualmente por 52 países (25 de ingresos altos, 20 de ingresos medianos y 7 de ingresos bajos de acuerdo con la clasificación del Banco Mundial). Sin embargo, México no se encuentra en la lista, lo cual debería preocuparnos como nación. Además, ese mismo año, la misma OMS realizó un llamado

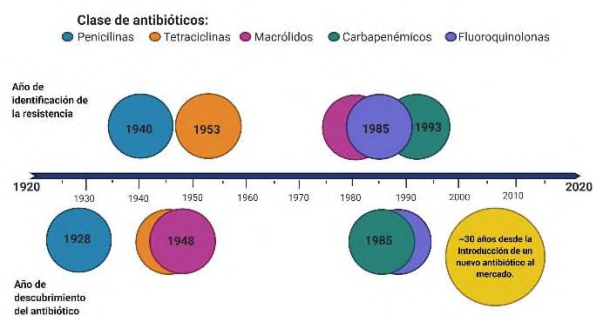
a las instituciones educativas para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos o alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas. Para esto, se publicó una lista dividida en tres categorías, de acuerdo con la prioridad en la que se necesitan los nuevos antibióticos: crítica, alta y media [5]. En el grupo de prioridad crítica están aquellas bacterias MDR que se encuentran comúnmente de manera intrahospitalaria como *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* y *Proteus*, afectando en su mayoría, a personas inmunocomprometidas o a pacientes que requieren dispositivos como catéteres intravenosos y ventiladores. En los grupos de prioridad alta y media se encuentran bacterias que provocan enfermedades comunes como la gonorrea, salmonelosis y cuadros respiratorios, pero que debido al aumento de cepas MDR se ha complicado el tratamiento de estas. En el grupo de prioridad alta se enlistan *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* y *Neisseria gonorrhoeae*; mientras que en el de prioridad media se encuentran *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella* spp. [4, 5].

### **Antibióticos: mecanismo de acción y de resistencia**

El mecanismo de acción de los antibióticos ha

sido ampliamente estudiado y se sabe que pueden actuar de dos formas: matando directamente a la bacteria (*i.e* agentes bactericidas) o inhibiendo su crecimiento (*i.e* agentes bacteriostáticos). Estos actúan sobre diversos blancos metabólicos esenciales como la síntesis de proteínas, la síntesis de DNA/RNA, de la pared celular o de la membrana celular [6]. Una de las causas por las que el desarrollo de nuevos antibióticos ha disminuido es que existe un número limitado de proteínas esenciales para la sobrevivencia de la bacteria y los más estudiados ya han sido explotados exhaustivamente en las últimas décadas [7]. Si a esto sumamos el poco interés que ha mostrado la industria farmacéutica en la búsqueda de nuevos antibióticos las posibilidades de éxito disminuyen. Sin embargo, una vez que aparece un nuevo antibiótico a los pocos meses o años se seleccionan bacterias resistentes a éste. En la figura 1 se presenta la línea de tiempo que representa el seguimiento que se les ha dado a los antibióticos desde su descubrimiento hasta la fecha en la que fueron reportadas cepas resistentes a éstos. Un claro ejemplo de la rapidez de la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos son las tetraciclinas; estas fueron introducidas al mercado en 1950 y tan solo tres años después ya comenzaba a ser ineficiente su uso para el tratamiento de

infecciones [8].



**Figura 1.** Línea de tiempo de la aparición de la resistencia antimicrobiana desde el descubrimiento de varias clases de antibióticos. Basada en [8] y modificada.

Por otro lado, para comprender la evolución de la resistencia a los antibióticos en bacterias patógenas se han descrito dos mecanismos principales que incluyen a la resistencia intrínseca y a la adquirida [9]. Cuando la bacteria tiene genes de resistencia dentro del cromosoma independientemente de que haya estado en contacto o no con el antibiótico previamente, se habla de resistencia intrínseca. Estos genes de resistencia generalmente se encuentran presentes en todas las cepas de la misma especie [10]. La resistencia adquirida se da por mutaciones en los genes del cromosoma que codifican para el sitio blanco del antibiótico. Esto puede ocurrir de forma natural por errores en la replicación o por métodos inducidos como la radiación o la acción de ciertos mutágenos. También mediante la adquisición de material genético foráneo por transferencia horizontal de genes (THG) que

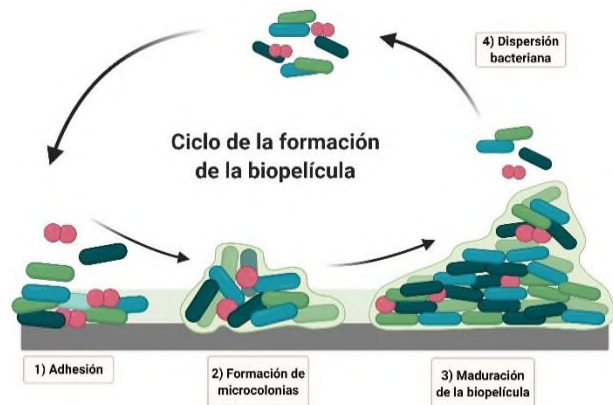
favorece la adquisición de resistencia a antibióticos. En este último se han estudiado varios mecanismos como la incorporación al cromosoma de segmentos de DNA libre en el ambiente (transformación), la infección por bacteriófagos (transducción), o a través del intercambio de plásmidos y transposones durante la conjugación [11].

Según el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios, CLSI por sus siglas en inglés (“Clinical and Laboratory Standards Institute”), la resistencia antimicrobiana se define como la habilidad de los microorganismos para resistir los efectos de uno o más agentes antimicrobianos a los que originalmente eran sensibles. Así que para comprender los mecanismos de resistencia antimicrobiana se han clasificado en tres grupos denominados “líneas de defensa” de acuerdo con el sitio de acción de la resistencia [12]. La primera línea de defensa es la formación de biopelícula por algunas cepas bacterianas; la pared, la membrana celular y las bombas de eflujo pertenecen a la segunda línea de defensa; y en última instancia, cuando el agente antimicrobiano se encuentra en la célula, los mecanismos bioquímicos y la regulación de genes juegan un papel importante, siendo esta la tercera línea de defensa.

### **Primera línea de defensa: formación de biopelícula**

Una biopelícula es una comunidad de microorganismos de una o diferentes especies adheridos a una superficie sólida biótica o abiótica [13]. Estas se encuentran recubiertas por una matriz de exopolisacáridos (EPS) que evita el acceso de los antibióticos a las células bacterianas que forman esa comunidad [14]. Existe una gran variedad de EPS que pueden formar la matriz de las biopelículas, dependiendo de los microorganismos presentes y de las condiciones ambientales como la temperatura, disponibilidad de nutrientes, humedad, entre otros. En general, los componentes mayoritarios en la biopelícula son: agua, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos; estos le proporcionan estabilidad, mediando la adhesión a las superficies y favoreciendo la formación de una red polimérica tridimensional que interconecta e inmoviliza de forma transitoria a las células que conforman la biopelícula [15]. La formación de biopelícula (Figura 2) se ha descrito en cuatro etapas: la primera comienza cuando las células bacterianas se adhieren a una superficie, seguido de la formación de microcolonias, la maduración de la biopelícula y por último la dispersión de células bacterianas para colonizar otras superficies cercanas [16]. La dificultad que se ha presentado para

contrarrestar infecciones causadas por bacterias formadoras de biopelícula es la penetración restringida de los agentes antimicrobianos, lo cual se debe a la exclusión por tamaño de estas moléculas, a interacciones electrostáticas con la matriz del EPS, a interacciones hidrofóbicas y a la degradación de estos debido a la acumulación de enzimas, como es el caso de catalasas que evitan la penetración de peróxido de hidrógeno a esta estructura [17, 18].

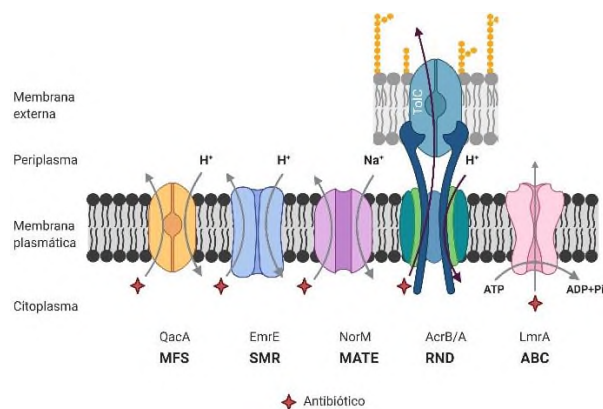


**Figura 2.** Etapas en la formación de biopelícula. 1) Adhesión de bacterias a una superficie, 2) formación de microcolonias, 3) maduración de la biopelícula y 4) dispersión de células bacterianas a otras superficies. Información basada en [16].

### Segunda línea de defensa: pared y membrana celular

La principal función de la pared celular bacteriana es mantener la forma de la célula, y la de la membrana es intercambiar nutrientes y moléculas de señalización con el medio, así como generar un gradiente electroquímico que participará en diversos procesos metabólicos. A su vez, estas dos estructuras celulares resultan

ser importantes sitios blanco de compuestos antimicrobianos como los  $\beta$ -lactámicos, glicopéptidos, fosfomicina y polimixina; por lo que alguna modificación en la estructura de estas barreras físicas puede contribuir o limitar la penetración o la acción de estos agentes [12]. Otro sistema de defensa dentro de esta categoría son las bombas de eflujo, estas se encuentran embebidas en la membrana citoplasmática o en la membrana externa de bacterias Gram-negativas y en la membrana citoplasmática de bacterias Gram-positivas. Éstas son capaces de transportar agentes antimicrobianos del citoplasma al medio, confiriendo resistencia al mismo. Las bombas de eflujo se dividen en dos grupos con base en el recurso energético para su funcionamiento (Figura 3): el primer grupo incluye a la súper familia ABC, las cuales hidrolizan ATP para obtener energía y en el



**Figura 3.** Familias de bombas de eflujo presentes en la membrana citoplasmática de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Dentro del grupo de bombas que utilizan el potencial de membrana para la obtención de energía se encuentran las familias MFS, SMR, MATE y RND. Por otro lado, la super familia ABC funciona mediante la hidrólisis de ATP [19].



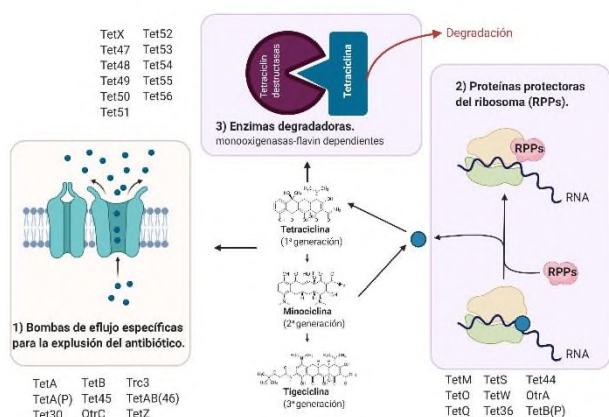
grupo secundario se encuentran aquellas que utilizan la energía del potencial electroquímico de la membrana (protones), como la súper familia facilitadora principal (MFS), la familia de extrusión de multidrogas y compuestos tóxicos (MATE) y la familia de resistencia menor a multidrogas (SMR), por sus siglas en inglés [19]. También se ha descrito en *E. coli* el transportador multidrogas Resistencia/Nodulación/División celular (RND) que consiste en tres dominios principales, el dominio membranal, el periplásmico y un dominio que interactúa con el canal TolC para la expulsión de los antibióticos [19, 20].

### **Tercera línea de defensa: regulación genética**

Cuando los antimicrobianos han pasado las barreras mencionadas anteriormente, las bacterias aún pueden lograr evadir la actividad de estos mediante diversas estrategias (tercera línea de defensa). En esta categoría se incluyen todos aquellos mecanismos que ocurren dentro de la célula como la alteración de los sitios blanco, la producción de agentes antagonistas y cambios en la regulación de la expresión de genes [12]. Por mencionar algunos ejemplos: se encuentra la producción de metabolitos secundarios que compiten con el antibiótico, lo desplazan y de esta forma evitan que estos actúen en su sitio blanco, tal es el caso de *S. aureus*, que presenta resistencia a las

sulfonamidas mediante un incremento en la producción de un análogo del antibiótico, el ácido para-aminobenzoico (PABA) [21]. Para aquellos antibióticos que actúan directamente en proteínas que participan en la replicación del DNA (DNA girasas y topoisomerasas), así como en la síntesis de RNA (RNA polimerasas), se han encontrado mutaciones que conllevan a modificaciones estructurales en los sitios de unión del antibiótico y, por lo tanto, estos no pueden llevar a cabo su actividad. Otro ejemplo de esta línea de defensa es la resistencia a las tetraciclinas, una clase de antibióticos que se unen al sitio A de la subunidad ribosomal 30S, evitando su asociación con el aminoacil-tRNA inhibiendo la síntesis de proteínas esenciales para el metabolismo bacteriano tales como reacciones enzimáticas, detección y transmisión de señales, la síntesis de proteínas estructurales, entre otras [22, 23]. La resistencia a este antibiótico resulta de la adquisición de elementos genéticos móviles que codifican para alguno de los tres mecanismos de resistencia conocidos como se muestran en la figura 4: producción de bombas de eflujo (que pertenecen a la segunda línea de defensa), de proteínas protectoras del ribosoma (RPPs, por sus siglas en inglés) y de enzimas degradadoras del antibiótico (monooxigenasas-flavin dependientes); estas últimas pertenecientes a la

tercera línea de defensa [22].



**Figura 4.** Mecanismos de resistencia a la tetraciclina. 1) Bombas de eflujo pertenecientes a la segunda línea de defensa bacteriana. En cuanto a la tercera línea de defensa se encuentran la síntesis de: 2) proteínas protectoras del ribosoma (RPPs) y 3) enzimas degradadoras del antibiótico; información basada en [22] y modificada.

### Diseño de nuevas estrategias para el combate a la resistencia antimicrobiana

En la última década, el interés en la producción de nuevos antibióticos por parte de las grandes compañías farmacéuticas ha disminuido dramáticamente debido a que se estima que el estudio de nuevos medicamentos requiere un tiempo de aproximadamente diez años y una inversión inicial de ochocientos millones de dólares; todo esto sin la certeza de que sean aprobados y lleguen al mercado; y una vez que esto sucede, a diferencia de los medicamentos empleados para el tratamiento de enfermedades crónicas, los antibióticos son administrados de cinco a catorce días; por lo que no se genera una ganancia monetaria continua [23]. Como ya se

había mencionado, otra dificultad que se ha presentado en el desarrollo de nuevos antibióticos es el número limitado de sitios blanco, recordando, que debe ser una proteína esencial que interfiera en la viabilidad bacteriana. Es por ello que se han buscado diversas alternativas para combatir las infecciones bacterianas, como el uso de dos fármacos con diferentes actividades. Tal es el caso del tratamiento a seguir en infecciones causadas por cepas resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos como *S. aureus*; en donde se usan inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico en conjunto con la amoxicilina (antibiótico  $\beta$ -lactámico), volviendo a la cepa sensible [24].

Además, se han propuesto otras estrategias para el tratamiento de infecciones bacterianas como la fagoterapia, la cual consiste en el uso de bacteriófagos (clase de virus que únicamente infectan bacterias). Esta terapia resulta ser muy específica debido a que cada tipo de bacteriófago infecta un determinado género bacteriano. Los fagos, como cualquier virus, al entrar en contacto con la superficie bacteriana inyectan su material genético, el cual se replica posteriormente mediante dos posibles ciclos biológicos de acuerdo al bacteriófago en cuestión: a) ciclo lítico, una vez que se ha formado la progenie viral la célula bacteriana es lisada, lo que conlleva a su muerte; y b) ciclo

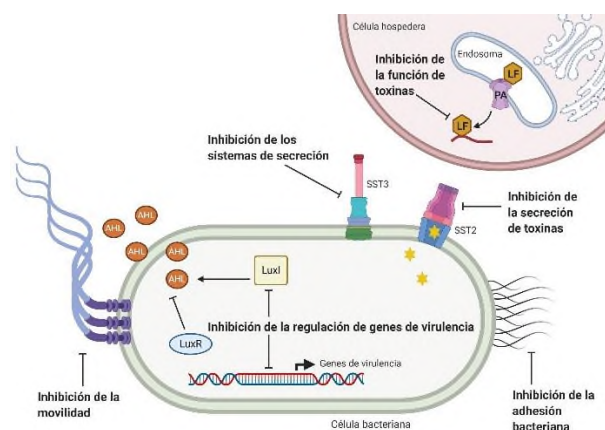


lisogénico, en el que el genoma viral es insertado en el cromosoma bacteriano (profago), y la información genética del virus es transmitida de manera vertical en cada división celular [25]. Para estos últimos, se ha estudiado recientemente la aplicación del sistema CRISPR-Cas9 para detectar los genes de resistencia a los antibióticos e inactivarlos [26]. Aún quedan muchas estrategias por explorar como el uso de fármacos antirresistencia, antivirulencia, péptidos antimicrobianos, uso de probióticos, estimuladores del sistema inmunológico, entre otros.

### Compuestos antivirulencia: una alternativa para el tratamiento de infecciones bacterianas

Diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de explorar nuevas rutas para combatir el problema de la resistencia antimicrobiana y una de las que ha llamado la atención es el desarrollo de compuestos antivirulencia, los cuales resultan ser una alternativa prometedora para el tratamiento de infecciones bacterianas MDR. Esta terapia se basa en bloquear los factores de virulencia que hacen a una bacteria patógena, esto sin afectar la viabilidad de la célula [27]. Se han considerado una diversidad de ventajas sobre la terapia clásica con antibióticos; entre ellos que no afecta la microbiota del paciente y también disminuye la

presión de selección, ya que únicamente interfiere en la expresión o actividad de los factores de virulencia, que en la mayoría de los casos no son indispensables para la sobrevivencia de una bacteria y de los cuales existen una gran diversidad de sitios blancos que pueden ser candidatos para ser bloqueados.



**Figura 5.** Sitios blanco propuestos para el desarrollo de la terapia antivirulencia. Se muestran los factores de virulencia que pueden ser inhibidos para evitar el establecimiento y colonización bacteriana en la célula hospedera [30].

De tal forma, el empleo de estos compuestos incrementaría la posibilidad de evitar la colonización, invasión e infección del hospedero, así como el daño tisular y la evasión del sistema inmune [28]. En la figura 5 se observan los factores de virulencia más estudiados, entre los que se encuentran: el “quorum sensing”, la formación de biopelículas, la movilidad, la secreción de toxinas y de proteínas efectoras, síntesis de enzimas y de surfactantes. Las bacterias

patógenas pueden contar con una o más de estas estructuras y mecanismos que favorecen la invasión en el huésped y una vez que la bacteria se encuentra dentro de la célula, se activan diversos mecanismos para detectar el ambiente en el que se encuentran y de esta forma activar los factores de virulencia necesarios para colonizar y causar daño [29, 30]. Los compuestos antivirulencia tienen la capacidad de interferir con la habilidad de la bacteria para reconocer las señales específicas del hospedero que la alertan al estar en el sitio de infección y de activar los genes que codifican para los factores de virulencia necesarios para establecerse [28, 29].

### **Inhibición de los sistemas de secreción y la movilidad**

Los sistemas de secreción son un factor de virulencia considerados nanomáquinas especializadas, esto debido a que presentan una estructura similar a una aguja que permite translocar (inyectar) proteínas efectoras a la célula hospedera y modular diversas funciones metabólicas, además de favorecer la internalización de la bacteria y la subsecuente colonización [31]. En particular abordaremos el sistema de secreción tipo III (SST3), presente en diversas especies de bacterias Gram-negativas, como *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*

enteropatógena y enterohemorrágica (EPEC y EHEC), *Chlamydia* spp. y *Salmonella* spp. [31]. Mediante diversos estudios se ha demostrado que algunos componentes del SST3 se encuentran conservados entre las diferentes especies, lo que nos ofrece la posibilidad de considerarlo como sitio blanco para compuestos antivirulencia y como herramienta para entender este complejo sistema [32]. El aparato del SST3 se compone de tres estructuras principales: el cuerpo basal, una región que abarca las membranas bacterianas internas y externas; el inyector que conecta a la célula bacteriana con la célula hospedera; y el poro translocador. Este sistema se activa cuando la bacteria se encuentra en contacto con la célula hospedera y diversas proteínas, denominadas efectores, son secretadas por el poro formado en la membrana de la célula hospedera por las proteínas translocadoras. Estos efectores inducen modificaciones en las células del hospedero para facilitar la internalización, la invasión y adaptación de la bacteria dentro de ella [33]. También inducen necrosis, apoptosis y atenuación del sistema inmune [34]. Algunas moléculas estudiadas para inhibir este complejo sistema son los flavonoides, como el licoflavonol. Algunos de estos pueden intervenir en la transcripción de genes involucrados con el SST3, afectando la secreción de proteínas efectoras o inhibiendo el

ensamblaje del sistema [35].

Por otro lado, se encuentra la movilidad mediada por el flagelo bacteriano; una estructura que tiene cierta similitud estructural con el SST3 [36]. Los flagelos son filamentos largos y helicoidales unidos a la membrana bacteriana y que le permiten el movimiento en medio líquido y sobre superficies [37]. La movilidad bacteriana está directamente ligada al proceso de invasión para algunas bacterias como *Salmonella*. Además, al flagelo se le atribuye la capacidad de inducir la activación del proceso proinflamatorio de citocinas debido a la composición de este por medio de la flagelina. Hasta el momento se han descrito algunos mecanismos por los cuales se pueden bloquear los sistemas de secreción especializados y a la maquinaria flagelar. Esto puede ser mediante la inhibición de la síntesis de proteínas estructurales, el ensamblaje del sistema o mediante la inhibición de la interacción bacteriana con la célula huésped para evitar la secreción de las proteínas efectoras [38]. Por otro lado, se han estudiado derivados de la salicil acilhidrazida por su capacidad de inhibir el SST3 en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediante el silenciamiento transcripcional de los genes relacionados a este sistema y se observó una disminución considerable de la invasión celular en un modelo murino. Además, se demostró

que afecta la movilidad bacteriana debido a la disminución en la expresión de la flagelina extracelular [39]. Si bien es cierto que aún falta mucho por explorar en este campo, se han obtenido resultados prometedores de la inhibición de ambos sistemas para disminuir la patogenicidad bacteriana.

### **Inhibición en la formación de biopelícula**

Una comunidad de microorganismos de una o diferentes especies adheridos a una superficie biótica o abiótica se denomina biopelícula; como ya se mencionó anteriormente, la composición de ésta depende de los microorganismos presentes y de las condiciones ambientales. La formación de una red polimérica limita la difusión de los fármacos por exclusión de tamaño y cambios en las cargas electrostáticas de los mismos. Además, generalmente las biopelículas conforman dos tipos de poblaciones: las bacterias aerobias y anaerobias. De tal forma que antibióticos como los aminoglucósidos, fluoroquinolonas y  $\beta$ -lactámicos que no son tan eficientes en condiciones de baja concentración de oxígeno, solo tendrán actividad sobre las células presentes en la superficie de la biopelícula [40]. La capacidad que presentan algunas bacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *P. aeruginosa* para formar biopelículas, permite que el patógeno se proteja de la

respuesta inmunológica del hospedero y de la actividad de los antibióticos en tejidos epiteliales y superficies de dispositivos médicos [41]. Se han descrito tres genes de virulencia involucrados con la formación de biopelícula, estos son: *cps*, gen codificante de la cápsula [42], *mrk* gen codificante de la fimbria tipo 3 [43] y los genes *wbbM* y *wzm* que codifican para enzimas de biosíntesis del antígeno O [44]. Además, participan otros genes como *luxS*, que regula el sistema tipo 2 de “quorum sensing” y el operón *pgaABCD* que se encarga de regular la síntesis y translocación de la adhesina poli- $\beta$ -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA), los cuáles favorecen el proceso de comunicación celular y la adhesión en las superficies [45]. La biopelícula ha sido de gran interés en los últimos años porque se ha dificultado el tratamiento de infecciones causadas por diversos patógenos involucrados en infecciones nosocomiales y fibrosis quística. Por lo que dentro de la búsqueda de compuestos inhibidores de biopelícula se ha propuesto la interrupción de la expresión de los genes mencionados anteriormente. Por otro lado, se ha propuesto bloquear los mecanismos que interfieren en las etapas de su formación, estos son mediante: a) la prevención de la adhesión bacteriana, b) la formación y maduración de la biopelícula, c) la interrupción de la secreción de las sustancias poliméricas extracelulares y c)

por la muerte de los microorganismos involucrados en la biopelícula madura [46]. Un agente antivirulencia en estudio para la inhibición de la formación de biopelícula es el anticuerpo monoclonal AR-105, este se ha utilizado en terapia combinada con antibióticos de primera generación para el tratamiento de neumonía, bacteriemia y fibrosis quística causadas por *P. aeruginosa*. Actualmente el estudio de este anticuerpo se encuentra en fase clínica 2, mostrando resultados prometedores; por lo que eventualmente podría convertirse en el primer tratamiento antivirulencia en el mercado [47].

### **Interfiriendo en la comunicación bacteriana “quorum sensing”**

La patogenicidad de diversas bacterias se encuentra regulada por un sistema de comunicación denominado “quorum sensing” (QS). Este sistema depende de la densidad celular y controla la producción de moléculas de señalización, denominadas autoinductores; los cuales estimulan la expresión de genes relacionados a diversos factores de virulencia tales como la formación de biopelícula, movilidad, esporulación, producción de enzimas y la conjugación [48]. En bacterias Gram-negativas se han descrito autoinductores como la acil-homoserin lactona (AHL); la cual es la clase más estudiada y comprendida a nivel

molecular; en el caso de bacterias Gram positivas se encuentran los autoinductores AI-2 y (s)-3-hidroxitridecano-4-1 (CAI-1) [49]. La membrana bacteriana es permeable a las AHLs y estas moléculas se unen a receptores citoplasmáticos, los cuales llevan a cabo la regulación de los diversos mecanismos de patogenicidad. En contraste, las bacterias Gram-positivas reconocen péptidos con diversas modificaciones postraduccionales como autoinductores, denominados péptidos autoinductores (PAI), y se unen a la membrana mediante la histidin cinasa o por receptores citoplasmáticos [50]. Se ha descrito que el autoinductor AI-2 se encuentra tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, representado así, un lenguaje químico universal mediante el cual bacterias de diferentes especies se pueden comunicar, por lo que se considera un sitio blanco atractivo para la interrupción del sistema [51]. La interferencia del “quorum sensing” se propone en tres mecanismos diferentes: (a) mediante la inhibición del generador de la molécula señal, (b) por la degradación de la molécula señal y (c) mediante el bloqueo del receptor [52]. Algunas investigaciones dedicadas a la interrupción de este sistema de comunicación se han enfocado en analizar el potencial de diversas moléculas aprobadas por la FDA (“Food and Drug Administration”), utilizando como modelo

bacteriano a *P. aeruginosa*. A partir de una biblioteca de más de mil compuestos reportados con baja toxicidad y propiedades farmacológicas favorables, se han realizado ensayos bioinformáticos para predecir las posibles interacciones moleculares entre el compuesto en cuestión y el regulador transcripcional PqsR, el cual es el encargado de promover la expresión de genes de virulencia; por lo que este regulador resulta ser un potencial blanco molecular para inactivar este sistema [53].

## CONCLUSIÓN

Atendiendo el comunicado por parte de la OMS a la innovación y desarrollo de nuevos fármacos para combatir las infecciones bacterianas causadas por cepas resistentes a los antibióticos, se propone el estudio de compuestos que bloqueen factores de virulencia presentes en bacterias patógenas. Una alternativa factible es la terapia antivirulencia, que tiene como objetivo inhibir el establecimiento y la colonización, sin afectar la viabilidad, de las bacterias. Para esto se han descrito diversos mecanismos para inhibir los factores de virulencia como la formación de biopelícula, el “quorum sensing”, los sistemas especializados de secreción y la movilidad bacteriana.

El estudio de nuevas estrategias para el

tratamiento de infecciones bacterianas resulta de gran impacto y, si bien, aún queda un largo camino por explorar, la terapia antivirulencia se posiciona para ser utilizada eventualmente en conjunto con los antibióticos convencionales.

El reto es aún mayor en estos tiempos de la pandemia por el SARS-CoV-2, causante del COVID-19, en los que se ha incrementado, por obvias razones, el uso de compuestos químicos para deshacernos del virus. Sin embargo, estos mismos químicos favorecerán indudablemente el surgimiento de cepas bacterianas con capacidades de sobrevivir a estos desinfectantes [54]. Así, debemos prepararnos para continuar la búsqueda e implementación de compuestos que nos ayudan a combatir a las bacterias multidrogo-resistentes actuales y a las que están por venir.

## **CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## **AGRADECIMIENTOS**

La investigación en nuestro laboratorio es financiada por la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP 20200738) del IPN y por un Proyecto Apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación no. A1-S-25438.

## **REFERENCIAS**

- [1] Mulvey MR, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be?. *CMAJ*. 2009;180(4):408–415.
- [2] Meek RW, Vyas H, Piddock LJ. Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use?. *PLoS Biol*. 2015;13(10):e1002266.
- [3] O'Neill, J. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev. Antimicrobial Resistance* 2014, 1 (1): 1-16.
- [4] Organización Mundial de la Salud: Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. at: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/surveillance/glass/es/> (Accessed on: March 23,2020)
- [5] Organización Mundial de la Salud: Lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos. At <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (Accessed on: April 27, 2020)
- [6] Clartworthy, A., Pierson, E., & Hung, D. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol* 2007, 3 (9), 541-548.
- [7] Gill EE, Franco OL, Hancock RE. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem Biol Drug Des*. 2015;85(1):56–78.
- [8] Public Health England. English Surveillance Programme for Antimicrobial Utilisation and Resistance (ESPAUR) Report 2018. United Kingdom: Pulic Health England.
- [9] Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(4):260–271.
- [10] Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, et al. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(1):44–65.
- [11] Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007;128(6):1037–1050.
- [12] Zhou G, Shi QS, Huang XM, Xie XB. The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):21711–21733.
- [13] Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001;9(1):34–39.
- [14] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):623–633.
- [15] Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol*. 2007;189(22):7945–7947.



- [16] Abdallah M, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib NE. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol.* 2014;196(7):453-472.
- [17] Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.* 2011;36(5):347-355.
- [18] Stewart PS, Roe F, Rayner J, et al. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(2):836-838.
- [19] Paulsen IT. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(5):446-451.
- [20] Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A: Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 2002, 419:587-593. Li J, Xie S, Ahmed S, et al. Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. *Front Pharmacol.* 2017;8:364.
- [21] Elufisan T. O. (2012). Updates on microbial resistance to drugs. *African Journal of Microbiology Research*, 6(23). doi:10.5897/ajmr11.436
- [22] Lin J, Zhou D, Steitz TA, Polikanov YS, Gagnon MG. Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design. *Annu Rev Biochem.* 2018;87:451-478.
- [23] Conly J, Johnston B. Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005;16(3):159-160.
- [24] Gill, E. E., Franco, O. L., & Hancock, R. E. W. (2014). Antibiotic Adjuvants: Diverse Strategies for Controlling Drug-Resistant Pathogens. *Chemical Biology & Drug Design*, 85(1), 56-78. doi:10.1111/cbdd.12478
- [25] Reina J, Reina N. Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? [Phage therapy, an alternative to antibiotic therapy?]. *Rev Esp Quimioter.* 2018;31(2):101-104.
- [26] Reardon S. Phage therapy gets revitalized. *Nature* 2014; 510:15-6. DOI: 10.1038/510015a
- [27] Vicente M, Hodgson J, Massidda O, Tonjum T, Henriques-Normark B, Ron EZ. The fallacies of hope: will we discover new antibiotics to combat pathogenic bacteria in time?. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(6):841-852.
- [28] Silva LN, Zimmer KR, Macedo AJ, Trentin DS. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chem Rev.* 2016;116(16):9162-9236.
- [29] Rasko DA, Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(2):117-128.
- [30] Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol.* 2007;3(9):541-548.
- [31] Kato J, Dey S, Soto JE, et al. A protein secreted by the *Salmonella* type III secretion system controls needle filament assembly. *Elife.* 2018;7:e35886.
- [32] Cornelis GR, Van Gijsegem F. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:735-774.
- Rosqvist R, Håkansson S, Forsberg A, Wolf-Watz H. Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of yersiniae, salmonellae and shigellae. *EMBO J.* 1995;14(17):4187-4195.
- [33] Blocker A, Jouihri N, Larquet E, et al. Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol Microbiol.* 2001;39(3):652-663.
- [34] Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(2):379-433.
- [35] Guo, Z., Li, X., Li, J., Yang, X., Zhou, Y., Lu, C., & Shen, Y. (2016). Licoflavonol is an inhibitor of the type three secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477(4), 998-1004.
- [36] Chilcott GS, Hughes KT. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):694-708.
- [37] Iyoda S, Kamidoi T, Hirose K, Kutsukake K, Watanabe H. A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog.* 2001;30(2):81-90.
- [38] Saini S, Slauch JM, Aldridge PD, Rao CV. Role of cross talk in regulating the dynamic expression of the flagellar *Salmonella* pathogenicity island 1 and type 1 fimbrial genes. *J Bacteriol.* 2010;192(21):5767-5777.
- [39] Negrea, A., Bjur, E., Ygberg, S. E., Elofsson, M., Wolf-Watz, H., & Rhen, M. (2007). Salicylidene Acylhydrazides That Affect Type III Protein Secretion in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), 2867-2876.
- [40] Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M., & Høiby, N. (2013). Applying insights from biofilm biology to drug development — can a new approach be developed? *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(10), 791-808.
- [41] Jagnow J, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology.* 2003;149(Pt 9):2397-2405.



- [42] Balestrino D, Ghigo JM, Charbonnel N, Haagenen JA, Forestier C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ Microbiol.* 2008;10(3):685–701.
- [43] Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence.* 2013;4(2):129–138.
- [44] Boddicker JD, Anderson RA, Jagnow J, Clegg S. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect Immun.* 2006;74(8):4590–4597.
- [45] Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe [published correction appears in Euro Surveill. 2008 Nov 27;13(48). pii: 19051]. *Euro Surveill.* 2008;13(47):19044.
- [46] Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Høiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed?. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(10):791–808.
- [47] Clinicaltrials. (2017, Enero 23). Adjunctive Therapeutic Treatment With Human Monoclonal Antibody AR-105 (Aerucin®) in *P. Aeruginosa* Pneumonia. (N. L. Medicine, Editor) Marzo 2020, from Clinicaltrials: <https://clinicaltrials.gov>
- [48] Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science.* 2006;311(5764):1113–1116.
- [49] Galloway WR, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M, Spring DR. Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev.* 2011;111(1):28–67.
- [50] Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR. Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev.* 2011;111(1):117–151.
- [51] Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11):a012427.
- [52] Geske GD, O'Neill JC, Blackwell HE. Expanding dialogues: from natural autoinducers to non-natural analogues that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Soc Rev.* 2008;37(7):1432-1447.
- [53] Mellini M, Di Muzio E, D'Angelo F, et al. *In silico* Selection and Experimental Validation of FDA-Approved Drugs as Anti-quorum Sensing Agents. *Front Microbiol.* 2019;10:2355.
- [54] Murray AK. The Novel Coronavirus COVID-19 Outbreak: Global Implications for Antimicrobial Resistance. *Front Microbiol.* 2020;11:1020.

